

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

17. 9. 2004

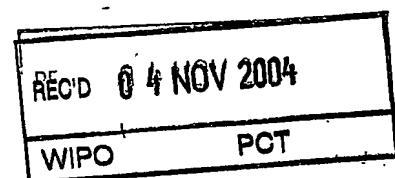
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 5月20日  
Date of Application:

出願番号 特願2004-150252  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2004-150252]

出願人 三井化学株式会社  
Applicant(s):

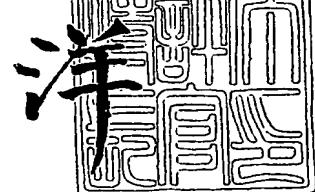


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



**【書類名】** 特許願  
**【整理番号】** P0003323  
**【提出日】** 平成16年 5月20日  
**【あて先】** 特許庁長官 殿  
**【国際特許分類】** C12N 1/00  
                          C12P 7/56

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内  
**【氏名】** 徳田 淳子

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内  
**【氏名】** 和田 光史

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内  
**【氏名】** 望月 大資

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内  
**【氏名】** 高橋 均

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内  
**【氏名】** 森重 敬

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内  
**【氏名】** 川嶋 美由貴

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内  
**【氏名】** 阿部 玲子

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内  
**【氏名】** 東 庸介

**【特許出願人】**  
**【識別番号】** 000005887  
**【氏名又は名称】** 三井化学株式会社  
**【代表者】** 中西 宏幸

**【手数料の表示】**  
**【予納台帳番号】** 005278  
**【納付金額】** 16,000円

**【提出物件の目録】**  
**【物件名】** 特許請求の範囲 1  
**【物件名】** 明細書 1  
**【物件名】** 図面 1  
**【物件名】** 要約書 1

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項1】**

TCA回路を有し、且つリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている微生物であって、更にピルベートホルムートリアーゼが不活化または低減されている、且つ／またはFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されていることを特徴とする微生物。

**【請求項2】**

該微生物が本来有しているアスパラギン酸アンモニアリアーゼが不活化または低減されている請求項1に記載の微生物。

**【請求項3】**

微生物が細菌である請求項1又は2に記載の微生物。

**【請求項4】**

細菌がエシェリヒア・コリである請求項3に記載の微生物。

**【請求項5】**

請求項1～4の何れか一項に記載の微生物を利用することを特徴とするD-乳酸の生産方法。

**【請求項6】**

TCA回路を有し、且つリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている微生物を培地を用いて培養することにより、TCA回路上で生産される有機酸以外の化合物を生産させる方法。

**【請求項7】**

微生物が、アスパラギン酸アンモニアリアーゼが不活化または低減されている微生物である請求項6記載のTCA回路上で生産される有機酸以外の化合物を生産させる方法。

**【請求項8】**

微生物が細菌である請求項6又は7に記載の生産方法。

**【請求項9】**

細菌がエシェリヒア・コリである請求項8に記載の生産方法。

**【請求項10】**

有機酸以外の化合物がD-乳酸である請求項6～9の何れか一項に記載の生産方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】コハク酸の副生が抑えられたD-乳酸生産微生物

【技術分野】

## 【0001】

本発明は、不純物であるコハク酸やフマル酸を生産せずにD-乳酸を生産する微生物と、それを用いたD-乳酸の生産方法に関するものである。

【背景技術】

## 【0002】

微生物を用いた発酵生産方法は、今日有力な物質生産方法の一つとなっている。現在までにクエン酸、ピルビン酸、L-乳酸等の有機酸や各種のアミノ酸、ビタミン、核酸等が糸状菌、酵母、細菌等の微生物を利用して工業生産されている。しかし微生物を用いた物質生産方法（以下バイオ物質生産法と呼ぶことがある）の問題の一つに副生物（目的とする物質以外の物質）の生成が挙げられる。いくら効率良く目的物質を生産し得る微生物であっても、生きている限り微生物は生命維持に必要な代謝反応を行わなければならず、それに伴い副生物が生じる訳である。バイオ物質生産法を工業化する際に重要なことは、目的物質の生産において如何に副生物を低減化させるかである。なぜなら副生物が多い場合には、その分だけ精製コストがかさみ、製造原価が高くなるからである。バイオ物質生産法としてエシェリヒア・コリでD-乳酸を発酵生産する場合を例にとると、培養液中にコハク酸やフマル酸などの副生物が蓄積しやすく、それら副生物生成の低減化が工業化生産上の課題の一つであった。

## 【0003】

エシェリヒア・コリでコハク酸生成を抑えながらD-乳酸を生産させる試みについては、既に幾つかの報告がなされている。チャンらはホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸への反応を触媒する酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（以下p p cと呼ぶことがある）の遺伝子を破壊することによってコハク酸が全く生産されなくなることを開示している（Chang, D.-E., et.al., Appl. Environ. Microbiol., Vol.65(4), pp1384-1389 (1999)）。またゾウラは、嫌気条件下で起こるフマル酸からコハク酸への反応を触媒する酵素フマル酸レダクターゼ（以下f r dと呼ぶことがある）の遺伝子を破壊することによってコハク酸が生産されなくなることを開示している（Zhou, S., et.al., Appl. Environ. Microbiol., Vol.69(1), pp399-407 (2003)）。しかしこれらの知見を、我々のD-乳酸生産エシェリヒア・コリに応用してみたところ、確かにコハク酸は生産されなくなるものの、同時にD-乳酸の生産性も低下した。つまり先行技術では、D-乳酸の生産性低下を起こさずにコハク酸生産を抑制することは不可能であった。

そこで我々はD-乳酸の生産性を損なうことなくコハク酸生産を抑制することを目標にして鋭意検討を重ね、その結果、嫌気条件下でオキサロ酢酸からリンゴ酸への反応を触媒する酵素リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（以下m d hと呼ぶことがある）の遺伝子を破壊することによって、D-乳酸の生産性を損なうこと無しにコハク酸の生成を完全に抑えることが可能であることを見出した。しかし依然としてフマル酸が副生されていたため、アスパラギン酸アンモニアリーゼ（以下a s p Aと呼ぶことがある）の遺伝子を破壊することによって、フマル酸の副生量をも低減化することが可能であることを見出した。

## 【0004】

m d h破壊の効果に関しては、1970年のコートライトらの論文に開示されている（Courtright, J. B. et.al., J. Bacteriol., Vol.102(3), pp722-728 (1970)）。その開示内容は、m d h遺伝子が破壊されたエシェリヒア・コリでは、嫌気条件下でのオキサロ酢酸からリンゴ酸への反応活性がゼロになっているものの、アスパラギン酸からフマル酸への反応活性が逆に向かっているというものであった。つまり嫌気条件下でコハク酸が生成する経路には、オキサロ酢酸からリンゴ酸を経由してフマル酸、コハク酸に流れる経路と、オキサロ酢酸からアスパラギン酸を経由してフマル酸、コハク酸に流れる経路の2種類があり、m d h遺伝子を破壊すると前者の経路は止まるが、後者の経路はむしろ活性化されることを説明している。よってコートライトらの論文は、m d h破壊によってコハク酸が

生成しなくなることを開示したものではない。

【0005】

*m d h*破壊の効果に関するもう一つの先行技術は、*m d h*遺伝子が破壊された酵母に関するものである（特開平11-056361号公報）。本特許は酵母の*m d h*遺伝子を破壊することによって、生産されるリンゴ酸量を変化させるというものであり、その結果がコハク酸の生産量にどのような影響をもたらすかについて言及したものではない。

【0006】

つまるところ過去の知見からは、微生物の*m d h*を破壊することによってコハク酸の生産が完全に抑制され得ることを容易に想定することは、当業者といえども困難であった。

【0007】

また*a s p A*活性欠損効果については、過去において唯一、エルシニア ペステイスでの知見が開示されている（Dreyfus, L.A., et.al., J. Bacteriol., Vol. 136(2), pp757-764 (1978)）。しかしながら、本論文の主旨は、*a s p A*活性の欠損によってアスパラギン酸やグルタミンが細胞内で分解されにくくなることであって、*a s p A*活性の欠損とフマル酸生成量についての考察はなされてはいない。

【0008】

【特許文献1】特開平11-056361号公報

【非特許文献1】Chang, D.-E., et.al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 65(4), pp1384-1389 (1999)

【非特許文献2】Zhou, S., et.al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 69(1), pp399-407 (2003)

【非特許文献3】Courtright, J.B., et.al., J. Bacteriol., Vol. 102(3), pp722-728 (1970)

【非特許文献4】Dreyfus, L.A., et.al., J. Bacteriol., Vol. 136(2), pp757-764 (1978)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

微生物を用いた工業的物質生産において、留意しなければならないことの一つは副生物の生成の問題である。特に目的物質が物理化学的に高純度であることが求められる場合には、副生物の生成の問題は一層重要となる。なぜなら副生物の種類や量が多ければ、その分だけ、高純度な目的物質を得るのに必要な精製工程が煩雑になり、精製コストが高くなるからである。特に物質生産に利用する微生物がTCA回路を有する微生物である場合には、TCA回路代謝中間体であるコハク酸やフマル酸が副生物として蓄積する場合がある。

。

【0010】

本発明は、目的物質の生産性を低下させることなく、副生物であるコハク酸及び/又はフマル酸の生産を抑制するD-乳酸の生産方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記課題を解決するためにこの改善策として、TCA回路を有し、且つリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性が不活化又は低減されている微生物を培地を用いて培養することにより、TCA回路上で生産される有機酸以外の化合物を生産させる方法が解決策として本発明の目的に適うことを見出した。そして更に、TCA回路を有し、且つリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている、且つアスパラギン酸アンモニアリーゼが不活化または低減されている微生物を用いて培養することにより、TCA回路上で生産される有機酸以外の化合物を生産させる方法が、本発明の目的に適うことを見出した。

【0012】

即ち、本発明は以下の通りである。

(1) TCA回路を有し、且つリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている

微生物であって、更にピルペートホルメートリアーゼが不活化または低減されている、且つ／またはFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されていることを特徴とする微生物。

[2] 該微生物が本来有しているアスパラギン酸アンモニアリアーゼが不活化または低減されている[1]に記載の微生物。

[3] 微生物が細菌である[1]又は[2]に記載の微生物。

[4] 細菌がエシェリヒア・コリである[3]に記載の微生物。

[5] [1]～[4]の何れか一項に記載の微生物を利用することを特徴とするD-乳酸の生産方法。

[6] TCA回路を有し、且つリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている微生物を培地を用いて培養することにより、TCA回路上で生産される有機酸以外の化合物を生産させる方法。

[7] 微生物が、アスパラギン酸アンモニアリアーゼが不活化または低減されている微生物である[6]記載のTCA回路上で生産される有機酸以外の化合物を生産させる方法。

[8] 微生物が細菌である[6]又は[7]に記載の生産方法。

[9] 細菌がエシェリヒア・コリである[8]に記載の生産方法。

[10] 有機酸以外の化合物がD-乳酸である[6]～[9]の何れか一項に記載の生産方法。

#### 【発明の効果】

##### 【0013】

本発明により、TCA回路上で生産される有機酸以外の化合物の生産性低下を招くことなく、コハク酸及び／又はフマル酸の副生を抑えることが可能となる。特にTCA回路上で生産される有機酸以外の化合物を工業的に生産することを目的とする場合、副生物の種類と量を低減化することで目的物質の精製コストの低減化が可能となる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0014】

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明においてTCA回路とは、糖・脂肪酸・多くのアミノ酸などの炭素骨格を最終的に完全酸化するための代謝経路であり、クエン酸回路、トリカルボン酸回路、クレプス回路とも呼ばれる。

##### 【0015】

本発明におけるリンゴ酸デヒドロゲナーゼとは、国際生化学連合(I.U.B.)酵素委員会報告に準拠した酵素番号1.1.1.37に分類され、リンゴ酸から、補酵素である酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの存在下でオキサロ酢酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素の総称を指す。

##### 【0016】

本発明における微生物とは、本来TCA回路を有する微生物のみならず、何らかの手段を用いることによりTCA回路を有するようになった微生物をも意味する。

##### 【0017】

本発明において酵素が不活化されている微生物とは、微生物が有する該酵素の活性が何らかの方法によって完全に消失せしめられた微生物を指し、酵素が低減されている微生物とは、微生物が有する該酵素の活性の一部が何らかの方法によって消失せしめられた微生物を指す。これらの微生物は、UV変異処理や変異剤処理を適当な条件で行うことによって作出することができ、また遺伝子組換え技術を用いて作出することも可能である。

##### 【0018】

本発明におけるリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている微生物としては、エシェリヒア・コリMT-10994(FERM P-19745)株、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を本発明の実施例の方法などにより破壊した菌株などが例示できる。尚、エシェリヒア・コリMT-10994(FERM P-19745)株は平成16年3月19日付けにて茨城県つくば市東一丁目1番1号中央第6にある独立行政法

人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに上記受託番号で寄託されている。

【0019】

本発明におけるピルベートホルメートリアーゼとは、国際生化学連合（I. U. B.）酵素委員会報告に準拠した酵素番号2. 3. 1. 54に分類され、ホルメートアセチルトランスフェラーゼとも呼ばれる酵素である。本酵素はピルビン酸からギ酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素の総称を意味する。

【0020】

本発明におけるFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼとは、D-乳酸から、補酵素である酸化型フラビンアデニンジヌクレオチドの存在下でピルビン酸を生成する反応を触媒する酵素の総称を意味する。

【0021】

本発明におけるリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている微生物であって、ピルベートホルメートリアーゼが不活化または低減されている、且つ／またはFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている微生物としては、エシエリヒア・コリMT-10994株を例示できる。

【0022】

本発明におけるアスパラギン酸アンモニアリーゼとは、国際生化学連合（I. U. B.）酵素委員会報告に準拠した酵素番号4. 3. 1. 1に分類され、アスパルターゼとも呼ばれる酵素である。本酵素はL-アスパラギン酸からフマル酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素の総称を意味する。該酵素が不活化した微生物としては、MT-10994株が例示できる。

【0023】

本発明における細菌とは、TCA回路を有し、上述の酵素の活性が不活化または低減化され得る分類学上の原核生物群の総称をさすが、細菌の中では特にエシエリヒア・コリが例示される。

【0024】

本発明における、微生物を利用することを特徴とするD-乳酸の生産方法とは、該微生物を用いてD-乳酸を生産する方法であれば特に制限はないが、好ましくは、該微生物を培地を用いて培養し、培養により得られた培地中にD-乳酸を生成蓄積せしめる方法が例示できる。その際使用される培地としては、該微生物がD-乳酸を生産するために必要な栄養源を含むものであれば特に制限されない。このような栄養源としては、炭素源、窒素源、無機イオン、微生物が要求する有機微量元素、核酸及びビタミン類等が挙げられ、これらから適宜選択したものを利用して培地を調製することができる。

【0025】

培養はフラスコ等を用いて、その中に液体培地を入れて振とう培養してもよいが、通常は液体培地を培養槽に入れて、温度調節及び攪拌をしながら行う。

【0026】

培養条件としては用いる微生物の種類や、用いられる培養装置によって適宜変更可能であるが、例えばMT-10994株のような微生物を使用する場合は温度を20℃から45℃、より好ましくは33℃から42℃で培養することが好ましい。またpHはN.a.OHやアンモニア等で6から8、より好ましくは7.1から7.3で調整し培養することが好ましい。培養時間は特に限定されないが、菌体が十分に増殖し、且つD-乳酸が生成するに必要な時間である。

【0027】

本発明の培養時の通気条件は、通気を全く行わなくともD-乳酸を生産することは可能であるが、より好ましい結果を得るために通気を行った方がよい。ここでいう通気条件下とは必ずしも培養液中を空気が通過する必要はなく、培養槽の形状によっては適度に培養液を攪拌しながら培養液上の空気層が換気されるような上面通気も含み、培養槽の内部に酸素を含む気体を流入させることを意味する。

【0028】

培地中に蓄積されたD-乳酸を回収する方法としては、例えば培養物を酸性化した後に直接蒸留する方法、乳酸のラクチドを形成させて蒸留する方法、アルコールと触媒を加え乳酸をエステル化した後に蒸留する方法、有機溶媒中に乳酸を抽出する方法、乳酸をイオン交換カラムで分離する方法、電気透析により乳酸を濃縮分離する方法などや、それらを組み合わせた方法が採用できる。

### 【0029】

本発明における、微生物を培地を用いて培養するとは、液体培地または固体培地の何れを用いて培養することをも意味するが、通常は液体培地を用いる方が好ましい結果が得られる。使用する培地としては、TCA回路上で生産される有機酸以外の目的化合物を生産するために必要な栄養源を含むものであれば特に制限されない。このような栄養源としては、炭素源、窒素源、無機イオン、微生物が要求する有機微量元素、核酸及びビタミン類等が挙げられ、これらから適宜選択したものを利用して培地を調製することができる。

### 【実施例1】

#### 【0030】

エシェリヒア・コリMG1655株ピルベートホルメートリアーゼB遺伝子欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり (GenBank accession number U00096), エシェリヒア・コリのピルベートホルメートリアーゼB (以下pf1Bと呼ぶことがある) をコードする遺伝子の塩基配列も報告されている (Genbank accession number AE000192)。pf1Bをコードする遺伝子 (2, 283 bp) の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号1、2、3及び4に示すオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。配列番号2, 3のプライマーは5'末端側にSphI認識部位を有している。

#### 【0031】

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAを、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) 記載の方法により調製し、得られたゲノムDNA 1 μgと、配列番号1の塩基配列を有するプライマーと配列番号2の塩基配列を有するプライマー、配列番号3の塩基配列を有するプライマーと配列番号4の塩基配列を有するプライマーの組み合わせで、上記プライマー-DNA各々100 pmolとを用いて、通常の条件でPCRを行うことにより約1.8 kb (以下pf1B-L断片と呼ぶことがある) 及び、約1.3 kp (以下pf1B-R断片と呼ぶことがある) のDNA断片を増幅した。このDNA断片をアガロース電気泳動にて分離、回収し、pf1B-L断片をHindIII及びSphIで、pf1B-R断片をSphI及びPstIでそれぞれ消化した。この消化断片2種と、温度感受性プラスミドpTH18csl (GenBank accession number AB019610) [Hashimoto-Gotoh, T., et.al., Gene, Vol.241(1), pp185-191 (2000)] のHindIII及びPstI消化物とをT4 DNAリガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリDH5αコンピテントセル (宝バイオ) に形質転換して、pf1Bをコードする遺伝子の5'上流近傍断片と3'下流近傍断片の2つの断片を含むプラスミドを得て、このプラスミドをpTHΔpf1Bと命名した。

#### 【0032】

このプラスミドをエシェリヒア・コリMG1655株に形質転換し、細胞が温度感受性プラスミドを保持できる30℃でクロラムフェニコール10 μg/mlを含むLB寒天プレート上で一晩培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をLB培地で30℃で3時間から一晩培養後、LB液体培地または生理食塩水で適当に希釈して、クロラムフェニコール10 μg/mlを含むLB寒天プレート上に塗布した。このLB寒天プレートを、温度感受性プラスミドを保持できない42℃で培養し、生育した形質転換体をゲノム外-ゲノム間相同組換えによりプラスミド全長がエシェリヒア・コリゲノムに組み込まれた株として得た。

#### 【0033】

この株からゲノムDNAを取得し、これを鋳型としたPCRを実施して、pTH18c s1が有するクロラムフェニコール耐性遺伝子がゲノム上に存在すること、およびp f 1 Bをコードする遺伝子の5'側近傍領域、及び3'側近傍領域のそれぞれと相同な領域がゲノム上に存在することをもってプラスミド全長がエシェリヒア・コリゲノムに組み込まれた株であることを確認した。

#### 【0034】

プラスミド全長がエシェリヒア・コリゲノムに組み込まれた株を、クロラムフェニコールを含まないLB液体培地20mlを入れた100mlのバッフル付きフラスコに植え、これを30℃で4時間振とう培養した。この培養液を適当にクロラムフェニコールを含まないLB液体培地で希釀し、クロラムフェニコールを含まないLB寒天培地上に塗布する。これを42℃で培養して生育したコロニーを無作為に96個選抜し、それぞれをクロラムフェニコールを含まないLB寒天培地上と、クロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に生育させ、クロラムフェニコール感受性の株を選抜した。

#### 【0035】

さらに選抜された株からゲノムDNAを取得し、これを鋳型としたPCRを実施して、p f 1 Bをコードする遺伝子が欠損した株を選抜し、これをMG1655p f 1 B遺伝子欠失株と命名した。

#### 【実施例2】

##### 【0036】

エシェリヒア・コリMG1655株p f 1 B遺伝子-FAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子二重欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり(GenBank accession number U00096)、エシェリヒア・コリの-FAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(以下dldと呼ぶことがある)をコードする遺伝子の塩基配列も報告されている(Genbank accession number AE000192)。dldをコードする遺伝子(1, 716bp)の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号5、6、7及び8に示すオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。

##### 【0037】

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNA 1μgと、配列番号の塩基配列を有するプライマー5と配列番号6の塩基配列を有するプライマー、配列番号7の塩基配列を有するプライマーと配列番号8の塩基配列を有するプライマーの組み合わせで、上記プライマー-DNA各々100pmolとを用いて、通常の条件でPCRを行った。こうして得られたそれぞれのDNA断片をアガロース電気泳動にて分離、回収し、配列番号5と配列番号6の組み合わせで得られたDNA断片をHindIII及びPstIで、配列番号7と配列番号8の組み合わせで得られたDNA断片をPstIとXbaIで消化することにより、それぞれ約1140bpのフラグメントを得た。この消化断片2種と、温度感受性プラスミドpTH18c s1のHindIII及びXbaI消化物とをT4DNAリガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリDH5αコンピテントセル(宝バイオ)に形質転換して、dldをコードする遺伝子の5'上流近傍断片と3'下流近傍断片の2つの断片を含むプラスミドを得て、このプラスミドをpTHΔdldと命名した。

##### 【0038】

プラスミドpTHΔdldをエシェリヒア・コリMG1655株p f 1 B遺伝子欠失株に形質転換し、最終的にMG1655株p f 1 B遺伝子-dld遺伝子二重欠失株を得る詳細な方法は、本発明の実施例1に記載された方法に準じた。

#### 【実施例3】

##### 【0039】

エシェリヒア・コリMG1655株p f 1 B遺伝子-dld遺伝子-mdh遺伝子三重欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり(GenBank ac

cession number U00096)、エシェリヒア・コリのm d h遺伝子の塩基配列も報告されている (Genbank accession number AE 000403)。m d hをコードする遺伝子 (939 bp) の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号9、10、11及び12に示すオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。配列番号9の塩基配列を有するプライマーは5'末端側にKpn I認識部位を、配列番号10、11の塩基配列を有するプライマーは5'末端側にBamH I認識部位を、配列番号12の塩基配列を有するプライマーは5'末端側にXba I認識部位をそれぞれ有している。

#### 【0040】

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNA  $1\ \mu\text{g}$ と、配列番号9と配列番号10、配列番号11と配列番号12の組み合わせで、上記プライマー-DNA各々  $1\ 0\ 0\ \mu\text{m}$  o1とを用いて、通常の条件でPCRを行うことにより約800 bp (以下m d h-L断片と呼ぶことがある) 及び、約1,000 bp (以下m d h-R断片と呼ぶことがある) のDNA断片を増幅した。このDNA断片をアガロース電気泳動にて分離、回収し、m d h-L断片をKpn I及びBamH Iで、m d h-R断片をBamH I及びXba Iでそれぞれ消化した。この消化断片2種と、温度感受性プラスミドpTH18cslのKpn I及びXba I消化物とをT4 DNAリガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリDH5 $\alpha$ コンピテントセル (宝バイオ) に形質転換して、m d hをコードする遺伝子の5'上流近傍断片と3'下流近傍断片の2つの断片を含むプラスミドを得て、このプラスミドをpTHΔm d hと命名した。

#### 【0041】

プラスミドpTHΔm d hをエシェリヒア・コリMG1655株p f 1 B遺伝子-d 1 d遺伝子二重欠失株に形質転換し、最終的にMG1655株p f 1 B遺伝子-d 1 d遺伝子-m d h三重欠失株を得る詳細な方法は、本発明の実施例1に記載された方法に準じた。

#### 【0042】

##### [比較例1]

エシェリヒア・コリMG1655株p f 1 B遺伝子-d 1 d遺伝子-p p c遺伝子三重欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり (GenBank accession number U00096)、エシェリヒア・コリのp p c遺伝子の塩基配列も報告されている (Genbank accession number AE 000469)。p p cをコードする遺伝子 (2,652 bp) の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号13、14、15及び16に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。配列番号14、15のプライマーは5'末端側にXba I認識部位を、配列番号16のプライマーは5'末端側にSac I認識部位をそれぞれ有している。

#### 【0043】

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNA  $1\ \mu\text{g}$ と、配列番号13と配列番号14、配列番号15と配列番号16の組み合わせで、上記プライマー-DNA各々  $1\ 0\ 0\ \mu\text{m}$  o1とを用いて、通常の条件でPCRを行うことにより約1,450 bp (以下p p c-L断片と呼ぶことがある) 及び、約750 bp (以下p p c-R断片と呼ぶことがある) のDNA断片を増幅した。このDNA断片をアガロース電気泳動にて分離、回収し、p p c-L断片をHindIII及びXba Iで、p p c-R断片をXba I及びSac Iでそれぞれ消化した。この消化断片2種と、温度感受性プラスミドpTH18cslのHindIII及びSac I消化物とをT4 DNAリガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリDH5 $\alpha$ コンピテントセル (宝バイオ) に形質転換して、p p cをコードする遺伝子の5'上流近傍断片と3'下流近傍断片の2つの断片を含むプラスミドを得て、このプラスミドをpTHΔp p cと命名した。

#### 【0044】

プラスミドpTHΔppcをエシェリヒア・コリMG1655株pflB遺伝子-d1d遺伝子二重欠失株に形質転換し、最終的にMG1655株pflB遺伝子-d1d遺伝子-ppc三重欠失株を得る詳細な方法は、本発明の実施例1に記載された方法に準じた。

【0045】

【比較例2】

エシェリヒア・コリMG1655株pflB遺伝子-d1d遺伝子-frd遺伝子三重欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり（GenBank accession number U00096）、エシェリヒア・コリのfrd遺伝子の塩基配列も報告されている（Genbank accession number AE000487）。本実施例で欠失を試みるfrd遺伝子は、frdAをコードする遺伝子（1,809bp）、frdBをコードする遺伝子（735bp）、frdCをコードする遺伝子（396bp）、及びfrdDをコードする遺伝子（360bp）の4種類の遺伝子を含む遺伝子である。frd遺伝子の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号17、18、19及び20に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。配列番号17のプライマーは5'末端側にEcoRI認識部位を、配列番号18、19のプライマーは5'末端側にBamHI認識部位を、配列番号20のプライマーはその内部にHindIII認識部位をそれぞれ有している。

【0046】

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNA1μgと、配列番号17と配列番号18、配列番号19と配列番号20の組み合わせで、上記プライマー-DNA各々100pmolとを用いて、通常の条件でPCRを行うことにより約600bp（以下frd-L断片と呼ぶことがある）及び、約800bp（以下frd-R断片と呼ぶことがある）のDNA断片を増幅した。このDNA断片をアガロース電気泳動にて分離、回収し、frd-L断片をEcoRI及びBamHIで、frd-R断片をBamHI及びHindIIIでそれぞれ消化した。この消化断片2種と、温度感受性プラスミドpTH18cslのEcoRI及びHindIII消化物とをT4DNAリガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリDH5αコンピテントセル（宝バイオ）に形質転換して、frdをコードする遺伝子の5'上流近傍断片と3'下流近傍断片の2つの断片を含むプラスミドを得て、このプラスミドをpTHΔfrdと命名した。

【0047】

プラスミドpTHΔfrdをエシェリヒア・コリMG1655株pflB遺伝子-d1d遺伝子二重欠失株に形質転換し、最終的にMG1655株pflB遺伝子-d1d遺伝子-frd三重欠失株を得る詳細な方法は、本発明の実施例1に記載された方法に準じた。

【実施例4】

【0048】

エシェリヒア・コリMG1655株pflB遺伝子-d1d遺伝子-mdh遺伝子-aspA遺伝子四重欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり（GenBank accession number U00096）、エシェリヒア・コリのaspA遺伝子の塩基配列も報告されている（Genbank accession number AE000486）。aspAをコードする遺伝子（1,482bp）の塩基配列近傍領域をクローニングするため、配列番号21、22、23及び24に示すオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。

【0049】

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNA1μgと、配列番号21と配列番号22、配列番号23と配列番号24の組み合わせで、上記プライマー-DNA各々100pmolとを用いて、通常の条件でPCRを行うことにより約910bp（以下aspA-

L断片と呼ぶことがある)及び、約1,100bp(以下aspA-R断片と呼ぶことがある)のDNA断片を増幅した。このDNA断片をアガロース電気泳動にて分離、回収し、AspA-L断片とAspA-R断片の両者ともにDNA Blunting Kit(宝バイオ)で末端を平滑化した後、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて定法にて5'末端をリン酸化した。一方温度感受性プラスミドpTH18cs1は、SmaI消化後、アルカリリボヌクレオチドキナーゼにて脱リン酸化処理を行った。上記のリン酸化した2種類の断片と、脱リン酸化したプラスミドをT4DNAリガーゼで反応した後、エシェリヒア・コリDH5 $\alpha$ コンピテントセル(宝バイオ)に形質転換して、aspAをコードする遺伝子の5'上流近傍断片と3'下流近傍断片の2つの断片を含むプラスミドを得て、このプラスミドをpTH $\Delta$ aspAと命名した。

#### 【0050】

プラスミドpTH $\Delta$ aspAをエシェリヒア・コリMG1655株p<sub>f</sub>1B遺伝子-d1d遺伝子-mdh遺伝子三重欠失株に形質転換し、最終的にMG1655株p<sub>f</sub>1B遺伝子-d1d遺伝子-mdh遺伝子-aspA遺伝子四重欠失株を得る詳細な方法は、本発明の実施例1に記載された方法に準じた。

#### 【実施例5】

##### 【0051】

エシェリヒア・コリMG1655株p<sub>f</sub>1B遺伝子-d1d遺伝子-mdh遺伝子三重欠失株によるD-乳酸、及びコハク酸の生産

前培養として4本の三角フラスコに入れたLB Broth、Miller培養液(Difco244620)25mlに、実施例2で得られたエシェリヒア・コリMG1655株p<sub>f</sub>1B遺伝子-d1d遺伝子二重欠失株(以下 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d株と呼ぶことがある)、実施例3で得られたエシェリヒア・コリMG1655株p<sub>f</sub>1B遺伝子-d1d遺伝子-mdh遺伝子三重欠失株(以下 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d $\Delta$ mdh株と呼ぶことがある)、比較例1で得られたエシェリヒア・コリMG1655株p<sub>f</sub>1B遺伝子-d1d遺伝子-ppc遺伝子三重欠失株(以下 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d $\Delta$ ppc株と呼ぶことがある)、比較例2で得られたエシェリヒア・コリMG1655株p<sub>f</sub>1B遺伝子-d1d遺伝子-frd遺伝子三重欠失株(以下 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d $\Delta$ frd株と呼ぶことがある)を別々に植菌し、一晩30℃、120rpmで攪拌培養を行った。その後、4台の1L容培養槽(ABL E社製培養装置BMJ-01)に、表1に示す培地475gを入れたものに、別々に上記フラスコ内容物全量を植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度200rpm、培養温度35℃、pH7.2(NaOHで調整)で32時間行った。培養終了後、得られた培養液中の乳酸、及びコハク酸濃度をHPLCで定法に従って測定した。乳酸蓄積の結果を図1に、コハク酸蓄積の結果を図2に示す。

乳酸については、 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d $\Delta$ mdh株が32時間で89g/L蓄積し、 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d株と同等の蓄積を示したのに対して、 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d $\Delta$ ppc株、 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d $\Delta$ frd株ではそれぞれ56g/L、71g/Lであった。

##### 【0052】

コハク酸については、 $\Delta$ p<sub>f</sub>1 $\Delta$ d1d株が32時間で3.8g/L蓄積したのに対して、残る3株はいずれも蓄積が見られなかった。

##### 【0053】

###### 【表1】

###### 培地組成

ブドウ糖	12%
コーンスティーブリカ (日本食品化工製)	5%
(残部:水)	

#### 【実施例6】

##### 【0054】

エシェリヒア・コリMG1655株p<sub>f</sub>1B遺伝子-d1d遺伝子-mdh遺伝子-a

## s p A 四重欠失株による D- 乳酸、及びフマル酸の生産

前培養として 2 本の三角フラスコに入れた LB Broth、Miller 培養液 (Difco 244620) 25 ml に、実施例 4 で得られたエシェリヒア コリ MG 1655 株 p f 1 B 遺伝子 - d 1 d 遺伝子 - m d h 遺伝子 - a s p A 四重欠失株 (以下  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株と呼ぶことがある) と実施例 3 で得られた  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株と別々に植菌し、一晩 30°C、120 rpm で攪拌培養を行った。その後、 $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株を別々に植菌し、一晩 30°C、120 rpm で攪拌培養を行った。その後、2 台の 1 L 容培養槽 (ABLE 社製培養装置 BMJ-01) に、表 1 に示す培地 475 g を入れたものに、別々に上記フラスコ内容物全量を植菌した。培養は大気圧下、通気量 0.5 vvm、攪拌速度 200 rpm、培養温度 35°C、pH 7.2 (NaOH で調整) で 48 時間行った。培養終了後、得られた培養液中の乳酸、及びフマル酸の濃度を HPLC で定法に従って測定した。乳酸蓄積の結果を図 3 に、フマル酸蓄積の結果を図 4 に示す。

## 【0055】

乳酸については、 $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株が 48 時間で 91 g/L、 $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株が 48 時間で 90 g/L と同等の蓄積を示した。

## 【0056】

フマル酸については、 $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株が 48 時間で 0.01 g/L の蓄積を、 $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株は 48 時間で 0.037 g/L の蓄積を示した。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0057】

【図 1】実施例 5 における培養液中乳酸蓄積濃度の経時変化を示したグラフである。図中、 $\times$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d$  株の結果を、 $\circ$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h$  株の結果を、 $\triangle$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta p p c$  株の結果を、 $\square$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta f r d$  株の結果を示す。

【図 2】実施例 5 における培養液中コハク酸蓄積濃度の経時変化を示したグラフである。図中、 $\times$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d$  株の結果を、 $\circ$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h$  株の結果を、 $\triangle$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta p p c$  株の結果を、 $\square$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta f r d$  株の結果を示す。

【図 3】実施例 6 における培養液中乳酸蓄積濃度の経時変化を示したグラフである。図中、 $\bullet$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株の結果を、 $\circ$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h$  株の結果を示す。

【図 4】実施例 6 における培養液中フマル酸蓄積濃度の経時変化を示したグラフである。図中、 $\bullet$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h \Delta a s p A$  株の結果を、 $\circ$  は  $\Delta p f 1 \Delta d 1 d \Delta m d h$  株の結果を示す。

【配列表】  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Mitsui Chemicals, Inc.

&lt;120&gt; A microorganism capable of producing D-lactate without producing by-products such as succinate

&lt;130&gt; P0003323

&lt;160&gt; 24

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 1

gcacgaaagg tttgattacg 20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 2

ttattgcattt ctttagatttg actgaaatcg 30

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 3

ttattgcattt cttattttact gcgtacttcg 30

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 4

aaggcctacg aaaagctgca g 21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 18

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 5  
caacaccaag ctttcgca 18

<210> 6  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 6  
ttccactcct tgtgggtggc 19

<210> 7  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 7  
aactgcagaa attacggatg gcagag 26

<210> 8  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 8  
tggcttagaa agttctttga c 21

<210> 9  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 9  
aaaggtagca gaataccatc tgctttgcc 30

<210> 10  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 10

aaaggatccc ctaaactcct tattatattg 30

<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR

<400> 11  
aaaggatcca aaccggagca cagactccgg 30

<210> 12  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Primer for PCR  
<400> 12  
aatctagaa tcagatcatc gtcgccttac 30

<210> 13  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 13  
acggagcatg acggcaagc 19

<210> 14  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 14  
aatctagaca ccccatctt tcgtttg 27

<210> 15  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 15  
tttctagatc ttccctttct gcaaacc 28

<210> 16  
<211> 28  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 16  
ctttgagctc acgcgaggcc aggttatac 28

<210> 17  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 17  
agtgaattct cacagccagt gcgccga 27

<210> 18  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 18  
agtggatccc gcatcgccaa tgtaaatcc 29

<210> 19  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 19  
agtggatccg acattcctcc agattgttt t 31

<210> 20  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220> 22  
<223> Primer for PCR  
<400> 20  
ataacgcaag aaagcttgtt ga 22

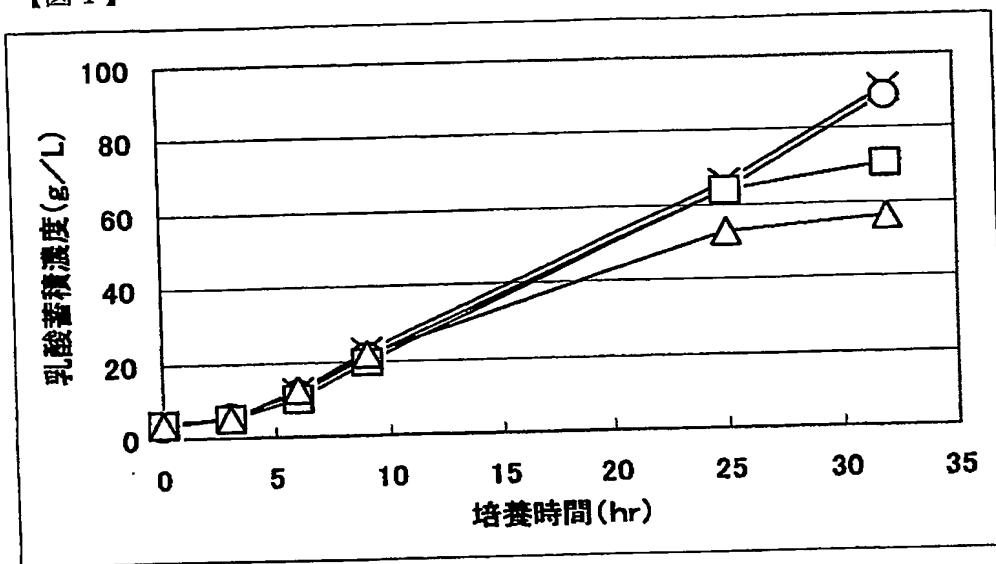
<210> 21  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 21  
ttttgagctc gatcaggatt gcgttggtgg 30

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 22  
cgaacagtaa tcgtacaggg 20

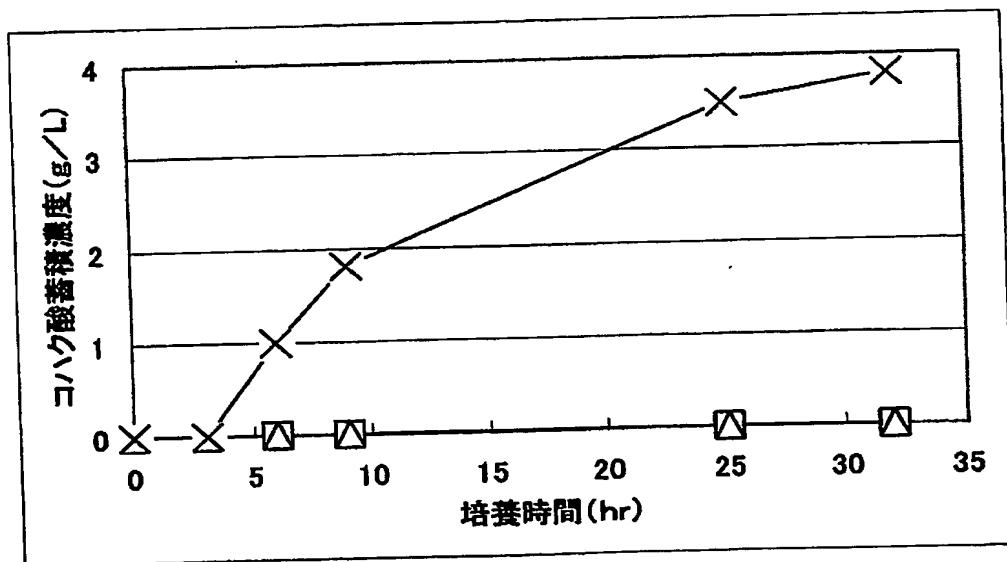
<210> 23  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 23  
tacgattact gttcggcattc gaccgaatac ccgag 35

<210> 24  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer for PCR  
<400> 24  
ttttctaga cctggcacgc ctctttctc 30

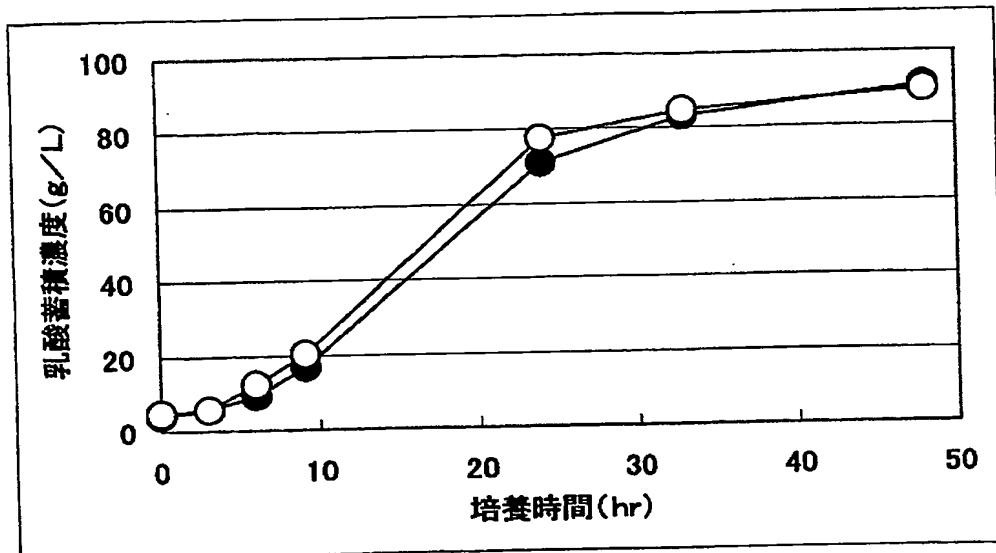
【書類名】図面  
【図1】



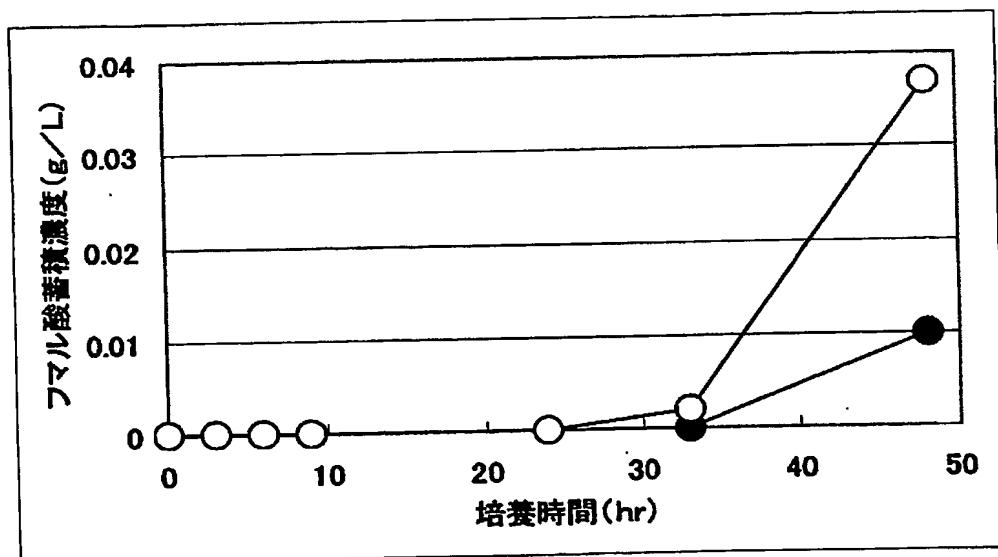
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】微生物を用いた工業化物質生産においては微生物が產生する副生物の問題がある。特にTCA回路を有する微生物では、コハク酸やフマル酸といったTCA回路中間体が副生物として生産されるため、目的物質の精製工程が複雑になり、製造コストが高くなる問題がある。本発明の目的は目的物質の生産性を下げることなくコハク酸やフマル酸の副生を抑えながら目的物質を製造することにある。

【解決手段】TCA回路を有し且つリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている微生物を培地を用いて培養することにより、さらにTCA回路を有し且つリンゴ酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されている且つアスパラギン酸アンモニアリアーゼが不活化または低減されている微生物を培地を用いて培養することにより、TCA回路上で生産される有機酸以外の化合物をコハク酸（またはコハク酸とフマル酸）の副生を抑えながら生産することが可能となる。

【選択図】なし

特願 2004-150252

出願人履歴情報

識別番号

[000005887]

1. 変更年月日 2003年11月 4日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区東新橋一丁目5番2号  
氏 名 三井化学株式会社